

## 研究报告 Original Papers

## 紫杆柽柳与其它物种脂质转运蛋白基因编码蛋白的同源性比较

王玉成\* 褚延广 姜静 杨传平 刘桂丰

东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040

**摘要** 根据从柽柳 cDNA 文库克隆获得的脂质转运蛋白(LTP)的部分序列, 用 RACE 技术克隆出其全长 cDNA 序列。基因的 5' 非翻译区 96 bp, 3' 非翻译区 222 bp, 开放阅读框 285 bp, 编码 94 个氨基酸, 预计蛋白的分子量为 9.9 kD, 等电点为 8.02。此基因有 8 个位置保守的 Cys 残基及 26 个氨基酸的信号肽, 为典型的植物脂质转运蛋白基因。其基因序列数据库 (GenBank) 登录号为 AY574218(基因)和 AAS79106(蛋白)。

**关键词** 紫杆柽柳; 脂质转运蛋白; 基因克隆; RACE

## Comparison of the Homology of Proteins Encoded by Lipid Transfer Protein (LTP) Genes from *Tamarix androssowii* and Other Species

WANG Yu-Cheng\*, CHU Yan-Guang, JIANG Jing, YANG Chuan-Ping, LIU Gui-Feng

College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040

**Abstract** Based on the partial sequence of a lipid transfer protein (LTP) gene acquired from a clone in *Tamarix androssowii* cDNA library, the LTP gene was cloned by using rapid amplification of cDNA end (RACE) technology. The acquired gene was 603 bp in length, including 96 bp of 5' untranslated region, 222 bp of 3' untranslated region, and an open reading frame (ORF) of 285 bp. The ORF region encoded a peptide of 94 deduced amino acid residues. The deduced molecular weight of protein was 9.9 kD and its isoelectric point was 8.02. This gene contained 8 cysteine residues that were conserved in amino acid sequence, and had a signal peptide with 26 amino acids. It was a typical plant LTP gene. The gene was accepted by GenBank, the accession numbers were AY574218(gene) and AAS79106(protein).

**Key words** *Tamarix androssowii*; lipid transfer protein; gene cloning; RACE

高等植物的脂质转运蛋白(lipid transfer protein, LTP)是一类小分子的碱性蛋白,其基本功能是能够在生物膜之间转运磷脂,并参与细胞内生物膜的形成<sup>[1]</sup>。此蛋白还参与植物的抗病反应,是一种植物抗病蛋白,在玉米、大麦体内可以抑制多种病原菌生长<sup>[2]</sup>。它可以受盐、旱胁迫,外源ABA<sup>[3,4]</sup>和冷胁迫<sup>[5]</sup>及损伤<sup>[6]</sup>等逆境诱导而表达量增加,是植物抵抗逆境胁迫的蛋白,在抗逆基因工程研究中有重要意义。

柽柳(*Tamarix* sp.)为灌木或小乔木,具有强的抗旱、耐盐能力,广泛分布于我国西北的荒漠中,是优良的防风固沙、水土保持和盐碱地造林树种。柽柳抗逆生理的研究已经有报道。如曾凡江等<sup>[7]</sup>研究了柽柳的水势日变化和蒸腾速率等水分生理特征。王霞等对不同种柽柳在水分胁迫时体

内膜保护酶及膜脂过氧化情况进行了研究<sup>[8]</sup>;并研究了脯氨酸、可溶性糖含量的变化及K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>积累规律<sup>[9]</sup>;还研究发现,缓慢水分胁迫下多枝柽柳和长穗柽柳内源激素ABA、IAA和GA含量均明显增加<sup>[10]</sup>。王燕凌等<sup>[11]</sup>研究了塔里木河下游两个断面不同水位下生长的柽柳组织中渗透性物质、SOD、POD等的变化规律。

但目前,柽柳抗逆的研究都集中在生理学方面,对柽柳抗逆基因克隆的研究尚未见报道。本文构建了紫杆柽柳(以下简称柽柳)cDNA文库,通

收稿 2004-07-30 修定 2004-12-01

资助 国家转基因植物研究与产业化专项(JY03A18)、国家重点基础研究发展规划("973")项目(G1999016000)。

\* E-mail: wangyucheng1029@yahoo.com.cn, Tel: 0451-82191627

通过对文库克隆测序, 获得了脂质转运蛋白基因片段。并以此为基础, 以 RACE 技术克隆出其全长 cDNA 序列。并通过对其 cDNA 序列分析, 揭示了此基因的信号肽、疏水性、功能氨基酸位置以及与其它物种脂质转运蛋白基因的同源性等信息。

## 材料与方法

盆栽三年生柽柳 (*Tamarix androssowii*) 用  $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NaHCO}_3$  溶液浇灌, 进行胁迫处理。胁迫 60 h 后, 取柽柳的叶片及嫩茎提取总 RNA, 并分离 mRNA, 应用 cDNA 文库构建试剂盒 (ZAP-cDNA<sup>®</sup>Synthesis Kit 和 ZAP-cDNA<sup>®</sup>GigapackIII<sup>®</sup> Gold Cloning Kit) 构建柽柳 cDNA 文库, 对文库的克隆进行随机测序 (MegaBACE<sup>™</sup> 1000 DNA 序列分析仪, 此项工作由本实验室完成)。获得的脂质转运蛋白基因部分序列, 经 BLASTX 分析发现, 此基因 3' 端完整, 5' 端缺乏约 33 个氨基酸, 为非全 cDNA 序列基因。根据已知序列, 设计 5' RACE 引物为: 5' AGGCGTCTGTTCCCTCAGTCTGCTGCAG 3'。

5' RACE 克隆脂质转运蛋白基因时, 取  $1 \mu\text{g}$  柽柳总 RNA 进行反转录 (具体操作步骤按试剂盒说明书进行), 转录完成后加 TE 缓冲液稀释到  $100 \mu\text{L}$ , 用作 RACE-PCR 和此基因编码区扩增的 PCR 模板。5' RACE 的 PCR 反应体系参照试剂盒 (Smart<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit, BD Biosciences) 说明书配制, PCR 反应使用降落 PCR (touchdown PCR) 程序, 修改为:  $94^\circ\text{C}$  预变性 1 min;  $94^\circ\text{C}$  6 s,  $72^\circ\text{C}$  3 min, 6 个循环;  $94^\circ\text{C}$  6 s,  $70^\circ\text{C}$  12 s,  $72^\circ\text{C}$  3 min, 5 个循环;  $94^\circ\text{C}$  6 s,  $68^\circ\text{C}$  12 s,  $72^\circ\text{C}$  3 min, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  保温 7 min。

RACE 的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电

泳, 回收目的片段。将回收片段与 pMD18-T 载体 [宝生物工程(大连)有限公司] 说明书连接, 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 在含 X-gal 和 IPTG 的氨苄青霉素的 LB 固体培养基上过夜培养。根据蓝白斑选择阳性克隆, 随机挑取 4 个阳性克隆, 提取质粒。以质粒为模板, 用 pMD18-T 两端的引物 RV-M 和 M13-47 进行 PCR, 鉴定插入片段的大小, 选择插入片段与目的片段大小相符合的克隆进行测序 (由上海博亚生物技术有限公司完成)。

用 NCBI 的两序列列队 (align two sequences) 程序进行序列的拼接, 拼接后的序列进行 BLAST 相似性比较, 用 ORF 查找程序寻找拼接后序列的开放读码框, 用多序列联配程序 [Clustalx (1.8)] 进行多序列比较和分子进化树的绘制。用信号肽预测程序 (SignalP 1.1) 预测蛋白的信号肽及可能的切割位点。

脂质转运蛋白的疏水性分析用 BioEdit 软件的疏水性分析程序 (Cornette Scale Mean Hydrophobicity profile) 进行。

## 实验结果

### 1 柽柳 cDNA 文库的建立

获得的柽柳 cDNA 文库滴度为  $5.6 \times 10^5$ , 其插入片段的大小在  $0.3 \sim 2.4 \text{ kb}$  之间。对扩增后的文库克隆进行随机测序, 将获得的序列除去 polyA 区后, 获得脂质转运蛋白基因部分序列长度为 421 bp。BLASTX 分析表明, 此序列与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的脂质转运蛋白、马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 的推定 (putative) 脂质转运蛋白、大麦 (*Hordeum vulgare*) 的非特异性脂质转运蛋白序列同源性很高。据我们推断, 此序列为脂质转运蛋白的部分序列。此片段的序列如下:

```
5' AAGTGAAGCATAAATTCATTACCCATATCATAAACTCACACATACATGTATATGAATTAGAGACT
CGCAATTGAACCAGABATATTCATTGATCCATAAGTTTAACAAGAGTACTTTATTCATAACAGCATATT
TTGCTTCATCAACTGGAAADGGCACTTCTGATCCTTAATTCACAGCCAGTTAAAGGATOGOGAGC
ACTAATTTCCAAAGAAGCATGCAAAATCCTAAACATCTAAAGCTGACACGGCAGGTCTAGCGACTT
TTTGGCCATTAGGAGAGTTAACAATTTGTCTAAGGTTTGGATCCCTGTAGTAGCCACAAAGGCA
GGCGTCTGTTCCCTCAGTCTGCTGCAGCAOCTGGCTGATGGAGGTCTCTGAGCCAGTAATGGCAC
CTGCACATGGACTCAGTTGTAGCCTGCTGCGG 3' (阴影部分为 5' RACE 引物序列区)。
```

### 2 RACE 片段的克隆与测序

通过 5' RACE-PCR 获得 1 个长约 300 bp 的特

异性扩增条带, 对此条带进行测序, BLASTX 分析显示此序列为脂质转运蛋白基因序列。应用

NCBI 的两序列列队程序将 5' RACE 获得的序列与文库中获得的脂质转运蛋白片段进行拼接, 获得其全长的 cDNA 序列, 并应用 NCBI 的 ORF 查找程序找到其开放读码框, 得到的桉柳脂质转运蛋白基因序列及由其推导的氨基酸序列(图 1)。

### 3 桉柳与其它物种脂质转运蛋白基因编码蛋白的同源性比较

对此序列进行 BLASTX 分析, 发现此种基因与 GenBank 中其它物种的脂质转运蛋白基因序列相似性在 28%~68% 之间。选取与此种基因相近的 7 个物种的脂质转运蛋白基因序列, 用多序列联配程序[Clustalx(1.8)]进行多序列比对(图2), 绘制进化树(图3)。

从 8 种植物的脂质转运蛋白的分子进化树可

以看出, 这 8 个物种的脂质转运蛋白可以大致分为 3 类, 桉柳脂质转运蛋白与马铃薯脂质转运蛋白在进化关系上较为接近, 而与其他植物的脂质转运蛋白在进化关系上较远。

信号肽预测程序分析表明, 脂质转运蛋白的前 26 个氨基酸疏水性较强, 可能在第 26(Glu)和第 27(Ala)氨基酸处存在信号肽切割位点(图1)。生物信息学分析结果表明, 此种蛋白的等电点为 8.02, 分子量为 9.9 kD。

### 4 脂质转运蛋白的疏水性

桉柳脂质转运蛋白的 1~26 区段氨基酸疏水性很强, 具有典型的信号肽特征, 其后有两段范围较广的疏水氨基酸, 其间有较短的亲水序列。此种蛋白含有高比例的疏水氨基酸(图 4)。

```

1   ACG CCG GGA CAG CAA AAC TCT CTC DCT CTC TCT CTC TCT CCG DCT   45
46   CAC TCA AAT TGT TCT GCT AGA ATC GTA GAT TTA CTA CTT TCC CCG   90
91   TAT ACT ATG AAC AAG GTT GTT TTC TGT ACT CTC TTA GCT GTG GTG   135
      Met Asn Lys Val Val Phe Cys Thr Leu Leu Ala Val Val   12
136  GTG GCC ACA ACA CTC TTA GGA GAG GCG GAA ATT GCA GAG GCA GTG   180
14   Val Ala Thr Thr Leu Leu Gly Glu Ala Glu Ile Ala Glu Ala Val   28
181  ACA TGT AGT CCA TTA CAA CTG AGT CCA TGT GCA GGT GCG APT ACT   225
29   Thr Cys Ser Pro Leu Gln Leu Ser Pro Cys Ala Gly Ala Ile Thr   43
226  GGC TCA GCA CTT CCA TCA GCG ACC TGC TGC ACC AGA CTG ACG GAA   270
44   Gly Ser Gly Pro Pro Ser Ala Thr Cys Cys Ser Arg Leu Arg Glu   58
271  CAG ACG CCT TGC CTT TGT GGC TAC TAC AGG GAT CCA AAC CTT AGA   315
59   Gln Thr Pro Cys Leu Cys Gly Tyr Tyr Arg Asp Pro Asn Leu Arg   73
316  CAA TAT GTT AAC TCT CTT AAT GCG CAA AAG GTC GCT AAG ACC TGC   360
74   Gln Tyr Val Asn Ser Pro Asn Ala Gln Lys Val Ala Arg Thr Cys   88
361  GGT GTC AGC GTT AGA TGT TAG GAT TTG CAT GCG TCT TGG AAA TTA   405
89   Gly Val Ser Val Arg Cys End
406  GTG CTC GCG ATC CTT AAC TGG CTG TGA ATT AAG GAT CAG AAG TGC   450
451  GTT TCC AGT TGA TGG AAG CAA AAT ATG CTG TTA TGA ATA AAG TAC   495
496  TCG TGT TAA ACT TAT GGA TCA ATG ATA TAT CTG GTC AAT TCC GAG   540
541  TCT CTA APT CAT ATA CAT GGA TGT GTG AGT TCA TGA TAT GCG TAA   585
586  TGA AAT TAT GCT TCA CTT   601

```

图1 桉柳LTP基因序列及由此推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of LTP from *T. androssowii*  
下划线部分的 26 个氨基酸为信号肽。

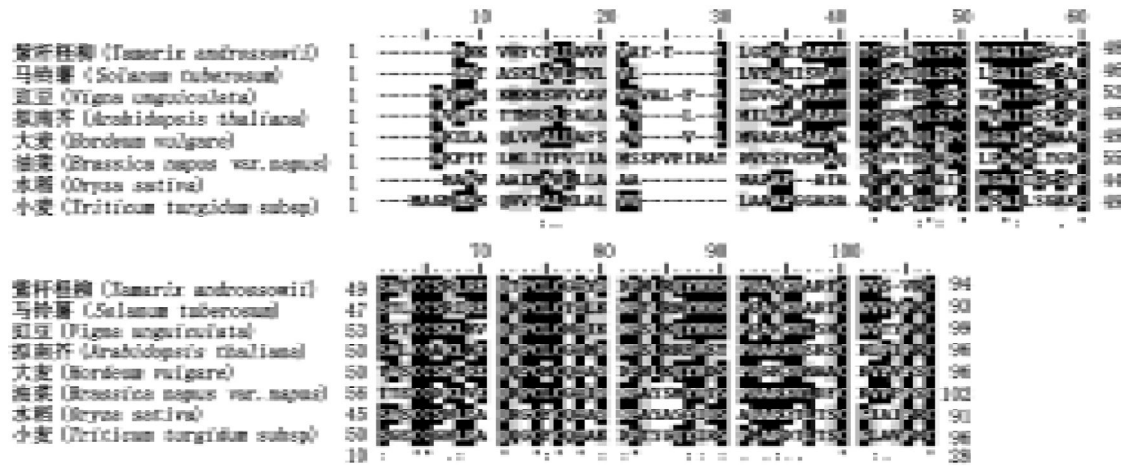


图2 几种植物LTP 的多序列比对  
Fig.2 Alignment of LTP from several plants

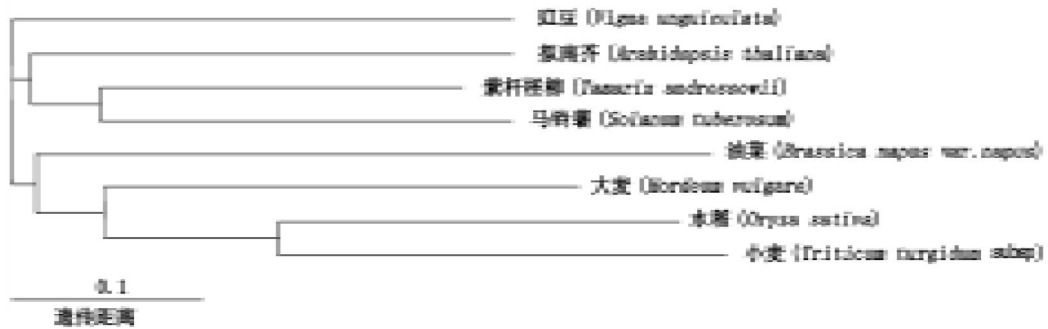


图3 植物LTP家族的分子进化树  
Fig.3 Molecular phylogenetic tree of the plant LTP family

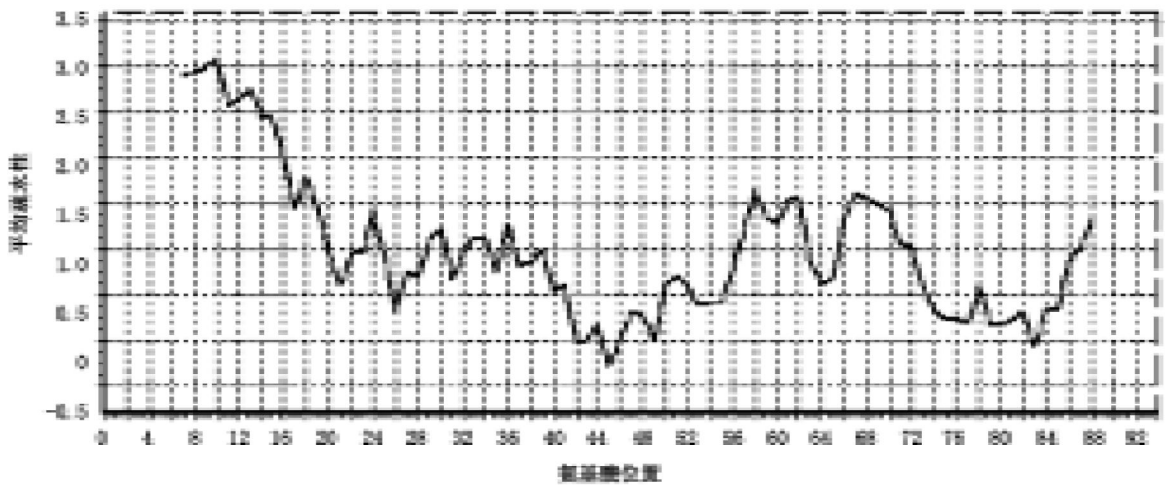


图4 柽柳LTP肽链亲/疏水性分布曲线  
Fig.4 Hydropathy of *T. androssowii* LTP

## 讨 论

RACE技术是1988年由Frohmanetal发明的一项新的基因克隆技术。与其他基因克隆技术相比,此技术具有简单、快速、廉价等优势,是一种从低丰度的转录本中快速扩增cDNA的5'和3'末端的简单而有效的方法<sup>[12]</sup>。本文采用的是BD Biosciences公司的RACE试剂盒,并在PCR过程中应用了降落PCR程序。实验中我们发现,用于RACE扩增的引物设计非常重要,不合适的引物很容易产生弥散、无扩增条带或非目的片段。而序列长、GC含量较高的引物扩增效率高,且特异性好。因此,进行引物设计时,最好选择GC含量较高的区域。同时,引物长度应不少于26个碱基,这样才能保证扩增产物的特异性。另外,我们将说明书推荐的降落PCR程序进行了改动,增加94℃预变性1min,同时,将94℃变性时间和退火时间适当延长,并增加循环次数。这样,PCR的扩增效果更好。

脂质转运蛋白是一类小分子量的碱性蛋白。据报道,在植物中这类蛋白中氨基酸序列的同源性在30%~70%之间<sup>[1]</sup>。说明脂质转运蛋白的氨基酸序列在不同物种之间的同源性相差较大。从脂质转运蛋白氨基酸多序列比较的结果可以发现,它们的信号肽区域(前30个左右的氨基酸)氨基酸的序列保守性较低,但都富含疏水性氨基酸。各个物种的脂质转运蛋白所含的8个半胱氨酸残基在位置上是完全相同的,具有高度的保守性,显然,这8个半胱氨酸残基对维持此蛋白功能起重要作用。这也是脂质转运蛋白的结构特点之一。

柽柳抗旱和耐盐能力非常强,而且是在可以在死亡之海——塔克拉玛干沙漠中存活的物种<sup>[13]</sup>。

说明其体内具有一系列活性较高的抗逆基因,因而可能是抗逆基因克隆的良好材料。脂质转运蛋白基因是植物体内的一种重要抗逆基因。此基因的克隆,对进一步揭示其结构和功能以及在抗逆基因工程中的应用可能有一定的参考意义。

## 参考文献

- 1 张明永,梁承邨.植物脂质转运蛋白的研究进展.生物化学与生物物理进展,2000,27(3):244~247
- 2 刘晓斐,徐久振,侯宇清等.水稻脂质转移蛋白基因的分离和分析.植物学报,1999,41(7):736~740
- 3 Liu KH, Lin TY. Cloning and characterization of two novel lipid transfer protein I genes in *Vigna radiata*. DNA Seq, 2003, 14(6):420~426
- 4 Wu G, Robertson AJ, Liu X et al. A lipid transfer protein gene BG-14 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*). Plant Physiol, 2004, 161(4):449~458
- 5 Jung SH, Lee JY, Lee DH. Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress. Plant Mol Biol, 2003, 52(3):553~567
- 6 Yubero-Serrano EM, Moyano E, Medina-Escobar N et al. Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. Exp Bot, 2003, 54(389):1865~1877
- 7 曾凡江,张希明,李小明.柽柳的水分生理特性研究进展.应用生态学报,2002,13(5):611~614
- 8 王霞,侯平,尹林克等.土壤水分胁迫对柽柳体内膜保护酶及膜脂氧化的影响.干旱区研究,2002,19(3):17~20
- 9 王霞,侯平,尹林克等.水分胁迫对柽柳植物可溶性物质的影响.干旱区研究,1999,16(2):6~11
- 10 王霞,侯平,尹林克等.土壤缓慢水分胁迫下柽柳植物内源激素的变化.新疆农业大学学报,2000,23(4):41~43
- 11 王燕凌,刘君,郭永平.不同水分状况对胡杨、柽柳组织中几个与抗逆能力有关的生理指标的影响.新疆农业大学学报,2003,26(3):47~50
- 12 唐克轩,开国银,张磊等.RACE的研究及其在植物基因克隆上的应用.复旦学报,2002(自然科学版),41(6):704~709
- 13 沙丁.流沙上的无叶柽柳.新疆林业,1998,24(5):36